

Gebrauchsanweisung



## LeukoStrat® *FLT3* Mutation Assay 2.0

Zum Nachweis von internen Tandem-Duplikationen (ITD) und Mutationen in der Tyrosinkinase-Domäne (TKD) im *FLT3*-Gen (fms-ähnliche Tyrosinkinase 3).

**IVD** Für die *In-vitro*-Diagnostik.



 Lagerbedingungen: **-85 °C bis -65 °C**

(DNA-Kontrollen können aus dem Assaykit genommen und bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.)

**Katalognummer**

**Produkte**

**Menge**

**REF** 94120091

LeukoStrat *FLT3* Mutation Assay 2.0 – ABI Fluorescence Detection

33 Reaktionen

# Inhalt

<b>1.</b>	<b>VERWENDUNGSZWECK .....</b>	<b>3</b>
<b>2.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES ASSAYS .....</b>	<b>3</b>
2.1.	Hintergrund.....	3
2.2.	Zusammenfassung.....	3
<b>3.</b>	<b>VERFAHRENSGRUNDLAGEN .....</b>	<b>3</b>
3.1.	Interne Tandem-Duplikationen (ITD) von <i>FLT3</i> .....	3
3.2.	Mutationen der Tyrosinkinase-Domäne (TKD) von <i>FLT3</i> .....	3
3.3.	Nachweis mittels differentieller Fluoreszenz.....	4
<b>4.</b>	<b>REAGENZIEEN .....</b>	<b>5</b>
4.1.	Reagenzienbestandteile .....	5
4.2.	Warn- und Vorsichtshinweise.....	6
4.3.	Lagerung und Handhabung.....	6
<b>5.</b>	<b>INSTRUMENTE .....</b>	<b>7</b>
5.1.	Thermocycler .....	7
5.2.	ABI 3130/3130xl oder 3500/3500xL.....	7
<b>6.</b>	<b>GEWINNUNG UND PRÄPARATION VON PROBEN .....</b>	<b>8</b>
6.1.	Vorsichtsmaßnahmen .....	8
6.2.	Störsubstanzen.....	8
6.3.	Anforderungen an und Handhabung von Proben.....	8
6.4.	Probenvorbereitung.....	8
6.5.	Probenlagerung.....	8
<b>7.</b>	<b>ASSAY-VERFAHREN .....</b>	<b>9</b>
7.1.	Enthaltene Materialien .....	9
7.2.	Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien.....	9
7.3.	Vorbereitung der Reagenzien.....	10
7.4.	Amplifikation.....	11
7.5.	Restriktionsverdauung nur für <i>FLT3D835</i> Master Mix .....	11
7.6.	ABI-Fluoreszenznachweis.....	12
7.7.	Qualitätskontrolle .....	12
<b>8.</b>	<b>INTERPRETATION DER ERGEBNISSE .....</b>	<b>13</b>
8.1.	Analyse .....	13
8.2.	Interpretation der Proben.....	14
<b>9.</b>	<b>GRENZEN DES VERFAHRENS .....</b>	<b>14</b>
<b>10.</b>	<b>ERWARTETE LÄNGE DER AMPLIFIZIERTEN PROBEN.....</b>	<b>14</b>
10.1.	Erwartete Länge der amplifizierten Proben .....	14
10.2.	Beispieldaten .....	15
<b>11.</b>	<b>LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN.....</b>	<b>16</b>
11.1.	Zusammenfassung der Daten .....	16
11.2.	Datenanalyse .....	18
11.3.	Schlussfolgerungen.....	18
<b>12.</b>	<b>VERWEISE.....</b>	<b>18</b>
<b>13.</b>	<b>TECHNISCHER SUPPORT UND KUNDENDIENST .....</b>	<b>18</b>
<b>14.</b>	<b>SYMBOLE .....</b>	<b>19</b>
<b>15.</b>	<b>HAFTUNGSHINWEIS .....</b>	<b>19</b>
15.1.	Gewährleistung und Haftung.....	19
15.2.	Patente und Warenzeichen.....	19

## 1. Verwendungszweck

Der LeukoStrat *FLT3* Mutation Assay 2.0 ist ein Produkt für die *In-vitro*-Diagnostik und dient der PCR-basierten Erkennung von *FLT3*-aktivierenden Mutationen bei Patienten mit akuter myelogener Leukämie (AML).

Insbesondere kann das *FLT3* Mutation Assay 2.0 für Folgendes eingesetzt werden:

- Identifizierung von internen Tandem-Duplikationen (ITD) im *FLT3*-Gen.
- Identifizierung von Mutationen in der Tyrosinkinase-Domäne (TKD) im *FLT3*-Gen.

## 2. Zusammenfassung und Erläuterung des Assays

### 2.1. Hintergrund

Akute myelogene Leukämie (AML) hat im Allgemeinen eine schlechte Prognose. Die Beurteilung der Mutationen des *FLT3*-Rezeptorgens (fms-ähnliche Tyrosinkinase 3) bei AML mit normalem Karotyp ist der wichtigste prognostische Indikator für den Krankheitsverlauf. Dies ist wichtig, da viele Studien mit AML gezeigt haben, dass *FLT3*-aktivierende Mutationen ein Zeichen für eine schlechte Prognose sind.<sup>1,2</sup> Aus diesem Grund sind Assays für *FLT3*-aktivierende Mutationen erforderlich, um die Krankheit zu klassifizieren und geeignete Behandlungsoptionen zu bestimmen. Dieser LeukoStrat PCR-Assay zielt auf bestimmte Bereiche des *FLT3*-Gens ab, um interne Tandem-Duplikationen (ITD) und Mutationen der Tyrosinkinase-Domäne (TKD), wie z. B. D835 und I836, zu identifizieren.

### 2.2. Zusammenfassung

Die Erkennung von *FLT3*-Mutationen, die weniger als 5 % der gesamten Zellpopulation umfassen, ist mit diesem Assay nicht zuverlässig. Hier ist klarzustellen, dass die Ergebnisse von molekularen Mutationsassays immer im Zusammenhang mit klinischen, histologischen und immunphenotypischen Daten interpretiert werden sollten.

Das Assaykit enthält 2 Master Mixes: den *FLT3* ITD Master Mix zur Erkennung von internen Tandem-Duplikationen und den *FLT3* D835 Master Mix zur Erkennung von Mutationen in der TKD-Region (wie z. B. Mutationen von D835 und I836).

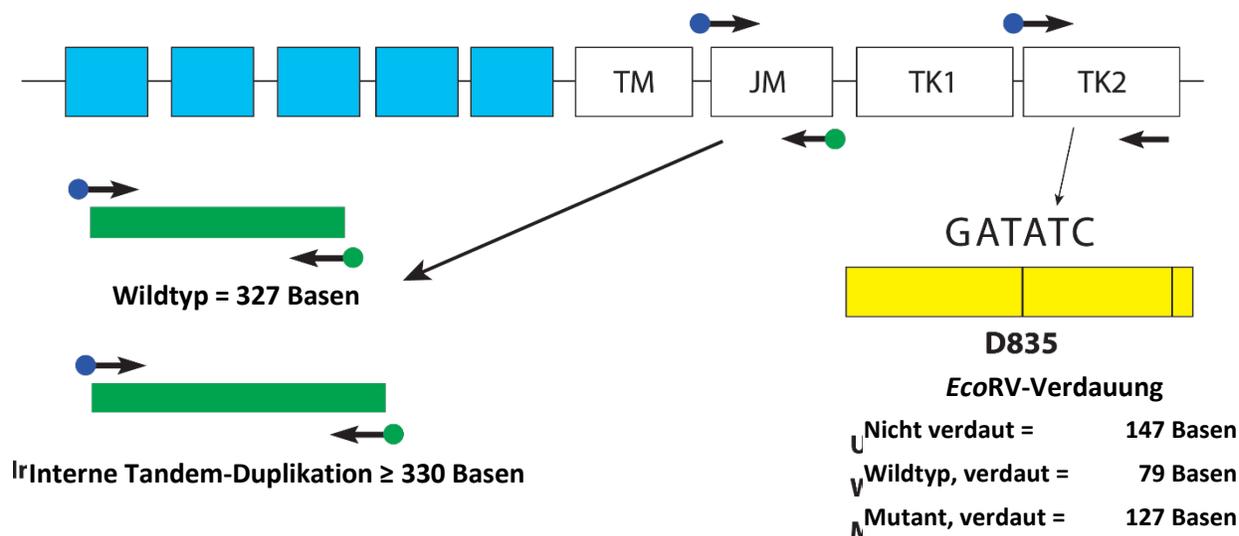
## 3. Verfahrensgrundlagen

### 3.1. Interne Tandem-Duplikationen (ITD) von *FLT3*

*FLT3*-interne Tandem-Duplikationen oder Längenmutationen werden durch die Duplikation oder Insertion eines Teils des *FLT3*-Gens, der die Region in und um die JM-Region (Juxtamembran) des *FLT3*-Gens enthält, verursacht. Diese Mutationen variieren sowohl in Position als auch Länge der eingesetzten duplizierten DNA-Sequenz. ITD-Mutationen führen zu konstituierender Autophosphorylierung und Aktivierung von *FLT3*<sup>1</sup>. Wildtyp *FLT3*-Allele werden mit diesem Assay amplifiziert und synthetisieren ein Produkt mit 327 Basenpaaren (bp). Allele mit ITD-Mutationen synthetisieren dagegen ein Produkt mit  $\geq 330$  bp.

### 3.2. Mutationen der Tyrosinkinase-Domäne (TKD) von *FLT3*

Mutationen der *FLT3*-Tyrosinkinase-Domäne (TKD) werden durch Nukleinsäure-Substitutionen hervorgerufen, die eine Änderung der Aminosäure-Sequenz im hoch konservierten katalytischen Zentrum verursachen. TKD-Mutationen, wie z. B. D835 und I836, führen zu konstitutiver Autophosphorylierung und Aktivierung von *FLT3*.<sup>2</sup> Die Wildtyp-Allele des *FLT3*-Gens enthalten eine Erkennungsstelle für EcoRV. Bei Auftreten einer Nukleinsäure-Substitution verschwindet die Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym und die EcoRV-Endonuklease kann die DNA an dieser Stelle nicht erkennen und verdauen. Unsere Assays verwenden Primer, die sich auf beiden Seiten der TKD-Region befinden. Die *FLT3*-Zielregion wird mittels PCR amplifiziert und danach durch EcoRV verdaut. Einer der PCR-Primer enthält eine EcoRV-Erkennungsstelle, sodass sowohl der Wildtyp als auch die mutierten Allele verdaut werden. Das Verdauungsprofil lässt den Verlust der normalen Gensequenz erkennen und stellt die Verdauung sicher. Wildtyp-Allele des *FLT3*-Gens führen zu Produkten mit 79 bp und mutierte Allele zu Produkten mit 124 bp oder 127 bp. Nichtverdaute Amplikons haben eine Produktlänge von 147 bp (Produktlängen wurden durch Verwendung des GeneScan™ - 600™ LIZ Size Standard v2.0 und des ABI3500xL-Geräts erhalten. Bei Anwendung von Standards mit anderen Längen und anderen Geräten können die Produktlängen abweichen).



**Abbildung 1.** Darstellung der *FLT3*-JM-Region und der Aktivierungsregion der Kinasedomäne. Grüne und blaue Punkte mit schwarzen Pfeilen repräsentieren die relative Position der Primer, die auf die JM-Region für ITD abzielen. Die übrigen blauen Punkte und schwarzen Pfeile repräsentieren die relativen Positionen der Primer, die auf TKD-Mutationen in der Aktivierungsregion der Kinasedomäne abzielen. Der gelbe Kasten hat vertikale schwarze Linien, die die Position der Erkennungsstellen für EcoRV-Verdauung im Wildtyp markieren.

### 3.3. Nachweis mittels differentieller Fluoreszenz

Nachweis mittels differentieller Fluoreszenz wird oft verwendet, um die Amplikonprodukte mit verschiedenen Längen mittels eines Kapillarelektrophorese-Geräts nachzuweisen. Primer können mit mehreren verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (Fluorophore) konjugiert werden, sodass diese nach Anregung mit einem Laser im Kapillarelektrophorese-Gerät verschiedene Emissionsspektren erzeugen. So repräsentieren verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe verschiedene Zielregionen. Dieses Nachweissystem bietet eine hohe Empfindlichkeit, Auflösung einzelner Nukleotide, Nachweis differentieller Produkte und relative Quantifizierung. Außerdem kann die Verwendung von Agarose- und Polyacrylamidgelen sowie von Karzinogenen wie Ethidiumbromid nahezu vermieden werden. Weiterhin ermöglicht der differentielle Nachweis die genaue, reproduzierbare und objektive Interpretation von Primer-spezifischen Produkten und das automatische Archivieren von Daten. Die Inter- und Intra-Assay-Reproduzierbarkeit der Längenbestimmung liegt bei ca. 1 bis 2 Nukleotiden. Die Reproduzierbarkeit und Empfindlichkeit in Kombination mit der automatischen Archivierung von Probanddaten ermöglichen die Überwachung, Nachverfolgung und den Vergleich von Daten individueller Patienten im Laufe der Zeit.

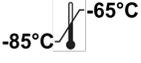
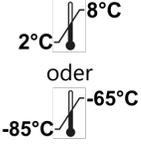
## 4. Reagenzien

### 4.1. Reagenzienbestandteile

**Tabelle 1.** Verfügbare Kits

Katalognummer	Beschreibung	Reaktionen insgesamt
 94120091	LeukoStrat <i>FLT3</i> Mutation Assay 2.0 – ABI Fluorescence Detection	33

**Tabelle 2.** LeukoStrat *FLT3* Mutation Assay 2.0 Bestandteile des Kits

Reagenz	Katalognummer	Reagenzienbestandteile (Wirkstoffe)	Menge pro Einheit	Anzahl der Einheiten	Lagerungstemperatur
<b>Master Mix</b>	24120011CE	<b><i>FLT3</i> ITD-Master-Mix – 6FAM &amp; HEX</b> Mehrere Oligonukleotide, die auf das <i>FLT3</i> -Gen abzielen, in gepufferter Salzlösung.	1500 µl	1	
	24120031CE	<b><i>FLT3</i> D835 Master Mix – 6FAM</b> Mehrere Oligonukleotide, die auf die <i>FLT3</i> -TKD-Region abzielen, in gepufferter Salzlösung.	1500 µl	1	
<b>DNAs für die Positivkontrolle</b>	40883390	<b><i>FLT3</i>-ITD-Positivkontrolle</b> 50 µg/ml DNA in 1/10-TE-Lösung	100 µl	1	
	40883400	<b><i>FLT3</i>-D835-Positivkontrolle</b> 50 µg/ml Plasmid-DNA in 1/10-TE-Lösung	100 µl	1	
<b>DNA für die Negativkontrolle</b>	40920030	<b><i>FLT3</i>-Negativkontrolle</b> 50 µg/ml DNA in 1/10-TE-Lösung	100 µl	1	

## 4.2. Warn- und Vorsichtshinweise

**ACHTUNG!** Lesen Sie die Gebrauchsanweisung aufmerksam durch, bevor Sie mit dem Assay beginnen, und halten Sie sich strikt an die Anweisungen.

- **IVD** Dieses Produkt ist für *In-Vitro*-Diagnostik vorgesehen.
- Das Assay-Kit ist als System zu verwenden. Verwenden Sie keine Reagenzien anderer Hersteller. Verdünnung, Reduzierung der Amplifikationsreaktionsvolumina und andere Abweichungen vom vorliegenden Protokoll können sich auf die Testergebnisse auswirken und/oder zur Ungültigkeit beschränkter Unterlizenzen führen, die mit dem Erwerb dieses Kits bereitgestellt werden.
- Die Materialien sind bis Ablauf des aufgedruckten Verfallsdatums stabil, wenn Handhabung und Lagerung wie hier beschrieben erfolgen. Kits nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Optimale Leistung und Reproduzierbarkeit können nur bei genauer Einhaltung des Protokolls gewährleistet werden. Stellen Sie sicher, dass die richtigen Programme für den Thermocycler ausgewählt werden, da ungeeignete Programme zu ungenauen/falschen Ergebnissen führen können, darunter auch falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse.
- Nur EcoRV für die Restriktionsenzymverdauung verwenden, da ein ungeeignetes Restriktionsenzym zu falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen führen kann.
- Reagenzien aus Kits mit unterschiedlichen Chargennummern nicht kombinieren.
- Sämtliche Laborverfahren sind mit Standardschutzkleidung (Handschuhe, Laborkittel und Augenschutz) durchzuführen. Labormitarbeiter sollten bei der Arbeit mit Proben guter Laborpraxis folgen und universelle Schutzmaßnahmen ergreifen. Proben sollten in zugelassenen biologischen Schutzeinrichtungen verarbeitet und nur in zugelassenen Sicherheitswerkbänken geöffnet werden.
- Es wird empfohlen, für die Präparation von DNA-Proben hochreines Wasser zu verwenden.
- Aufgrund der analytischen Empfindlichkeit dieses Testverfahrens sind Kontaminationen der Reagenzien oder Amplifikationsmischungen durch Proben, Kontrollen oder amplifizierte Stoffe zu vermeiden. Sämtliche Reagenzien sind auf Anzeichen einer Kontamination hin zu überwachen (z. B. Negativkontrollen mit positivem Ergebnis). Reagenzien, bei denen der Verdacht einer Kontamination besteht, sind zu entsorgen.
- Zur Minimierung des Kontaminationsrisikos Handschuhe tragen, wenn Proben und Reagenzien verarbeitet werden, und Arbeitsbereiche und Pipetten vor der PCR regelmäßig reinigen.
- Der Arbeitsablauf im PCR-Labor sollte zwischen verschiedenen Arbeitsbereichen in einer festen Reihenfolge und räumlich getrennt ablaufen: zunächst Vorbereitung des Master Mix, anschließend Vorbereitung der Proben und Amplifikation, abschließend die Messung. Autoklavieren beseitigt keine DNA-Kontaminationen. Amplifizierte DNA sollte nicht in den Bereich gebracht werden, der für die Zubereitung der Master Mixes oder Proben vorgesehen ist. Alle in einem bestimmten Laborbereich verwendeten Pipetten, Pipettenspitzen und andere Ausstattungen sollten in diesem Laborbereich verbleiben.
- Produkte, die nicht entsorgt werden können, müssen zweimal in 10%iger Bleichelösung dekontaminiert und mit destilliertem Wasser gespült werden, bevor sie in den Ausgangsbereich zurückgebracht werden können. Wann immer möglich sollten sterile Kunststoffprodukte für den Einmalgebrauch verwendet werden, um einer Kontamination vorzubeugen.

## 4.3. Lagerung und Handhabung

- Längerfristig sollten Assay-Kits bei **-85 °C bis -65 °C** gelagert werden.
- Die optimale Lagertemperatur für DNA-Kontrollen beträgt 2 °C bis 8 °C, DNA-Kontrollen können jedoch auch bei Temperaturen von -85 °C bis -65 °C gelagert werden.
- Alle Reagenzien und Kontrollen müssen vor der Verwendung aufgetaut und gründlich gevortext und gemischt werden, um sicherzustellen, dass sie vollständig resuspendiert wurden. Übermäßiges Vortexen kann die DNA zertrennen und dazu führen, dass Primer ihre Fluorophore verlieren.
- Die Materialien sind bis Ablauf des aufgedruckten Verfallsdatums stabil, wenn Handhabung und Lagerung wie hier beschrieben erfolgen. Kits nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Aufgrund ihrer hohen Salzkonzentrationen sind PCR-Master-Mixes hochgradig anfällig für durch Gefrier- und Tauzyklen entstehende Schäden. Die Master Mixes in sterile Röhrchen mit Schraubverschluss mit O-Ring aliquotieren, falls relevant.

## 5. Instrumente

### 5.1. Thermocycler

- Zweck oder Funktion: Amplifikation von DNA-Proben
- Empfohlenes Instrument: Veriti™ Dx Thermal Cycler oder ein ähnliches Gerät
- Leistungseigenschaften und Spezifikationen:
  - Temperaturmindestanforderungen: 15 °C bis 96 °C
  - Mindestgeschwindigkeit der Temperaturerhöhung: 0,8 °C/Sek.
- Den Installations-, Betriebs-, Kalibrierungs- und Wartungsanweisungen des Herstellers Folge leisten.
- Angaben zum Thermocyclerprogramm finden Sie in Abschnitt 7.4 *Amplifikation*.

### 5.2. ABI 3130/3130xl oder 3500/3500xL

- Zweck oder Funktion: Nachweis und Analyse von Fragmenten
- Leistungseigenschaften und Spezifikationen:
- Die folgenden Kapillarelektrophorese-Geräte erfüllen die Leistungsanforderungen für diesen Assay:
  - ABI 3130 Genetic Analyzer\* (4 Kapillaren)
  - ABI 3130xl Genetic Analyzer\* (16 Kapillaren)
  - ABI 3500 Genetic Analyzer\* (8 Kapillaren)
  - ABI 3500xL Genetic Analyzer\* (24 Kapillaren)
- Den Installations-, Betriebs-, Kalibrierungs- und Wartungsanweisungen des Herstellers Folge leisten.
- Die Genetic Analyzers sollten mit dem DS-33 Matrix Standard für das Dye Set G5 kalibriert werden (empfohlen). Der DS-30 Matrix Standard für das Dye Set D kann mit der 3130-Serie verwendet werden (alternative Option).
- Verwenden Sie die Standardeinstellungen für den gegebenen Polymer- und Kapillartyp.
- Angaben zur Probenvorbereitung finden Sie in Abschnitt 7.6 *ABI-Fluoreszenznachweis*.

**\*Warnung:** Diese Produkte verfügen nicht über eine CE-Kennzeichnung.

## 6. Gewinnung und Präparation von Proben

### 6.1. Vorsichtsmaßnahmen

Biologische Proben von Menschen können potenziell infektiöse Stoffe enthalten. Sämtliche Proben sind in Einklang mit dem Programm für blutübertragbare Krankheitserreger bzw. gemäß biologischer Schutzstufe 2 zu handhaben.

### 6.2. Störsubstanzen

Folgende Substanzen stören bekannterweise die PCR:

- Zweiwertige Kationenchelatoren
- Low-Retention-Pipettenspitzen
- EDTA (in geringen Konzentrationen zu vernachlässigen)
- Heparin
- Zellen suspendiert in einem Fixativ, z. B. Essigsäure, B5 usw.

### 6.3. Anforderungen an und Handhabung von Proben

Dieser Assay testet genomische DNA aus folgenden Quellen:

- Peripheres Blut oder Knochenmarkaspirate, die mit Heparin, EDTA oder ACD antikoaguliert wurden, oder isolierte mononukleäre Zellen, frisch in einem geeigneten Medium (RPMI oder ähnlich) oder eingefroren in einem geeigneten Kryokonservierungsmedium.
- Peripheres Blut und Knochenmarkaspirate können bis zu 7 Tage bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden, um gültige Daten zu erhalten. Frisch isolierte mononukleäre Zellen können bis zu 7 Tage oder bei geeigneter Kryokonservierung unbegrenzt gelagert werden.
- 500 ng genomische DNA (gelagert bei 2 °C bis 8 °C oder unter -15 °C und bei Umgebungstemperatur, gekühlt oder auf Trockeneis versandt).

### 6.4. Probenvorbereitung

Extrahieren Sie die genomische DNA aus der Patientenprobe so bald wie möglich. DNA-Proben werden auf eine Endkonzentration von 50 µg/ml standardisiert.

### 6.5. Probenlagerung

Genomische DNA bei Temperaturen zwischen 2 °C und 8 °C oder unterhalb von -15 °C lagern.

## 7. Assay-Verfahren

### 7.1. Enthaltene Materialien

Angaben zu den im Lieferumfang enthaltenen Materialien finden Sie in Tabelle 2.

### 7.2. Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien

**Tabelle 3.** Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien

Reagenz/Material	Empfohlene Reagenzien/Materialien und Anbieter	Katalognummer	Anmerkungen
<b>DNA-Polymerase</b>	Roche®: • EagleTaq™ DNA-Polymerase	05206944190	keine Angabe
	Invivoscribe, Inc.: • FalconTaq DNA-Polymerase oder gleichwertig	60970130	
<b>Wasser für die Molekularbiologie</b>	keine Angabe	keine Angabe	Wasser sollte steril und frei von DNase und RNase sein.
<b>Kalibrierte Pipetten</b>	BIOHIT: • Proline® • eLine® Rainin: • P-2-, P-20-, P-200- und P-1000 Pipetten oder • SL-2-, SL-20-, SL-200- und SL-1000-Pipetten	keine Angabe	Müssen für die genaue Messung von Volumina zwischen 1 µl und 1000 µl geeignet sein.
<b>Thermocycler</b>	Life Technologies: • Veriti™ Dx Thermocycler	4452300	keine Angabe
<b>EcoRV-Endonuklease</b>	New England Biolabs • EcoRV 20.000 Einheiten/ml	R0195S oder R0195L	keine Angabe
<b>NEBuffer 3.1</b>	New England Biolabs • NEBuffer 3.1	B7203S	Im Lieferumfang des EcoRV-Restriktionsenzym enthalten
<b>Vortexmischer</b>	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe
<b>PCR-Platten oder -Röhrchen</b>	keine Angabe	keine Angabe	Steril
<b>Pipettenspitzen mit Filter</b>	keine Angabe	keine Angabe	Steril, ohne RNase/DNase/Pyrogene
<b>Mikrozentrifugenröhrchen</b>	keine Angabe	keine Angabe	Steril
<b>ABI Kapillarelektrophorese-Gerät</b>	Applied Biosystems®: • ABI 3130 Genetic Analyzer Serie • ABI 3500 Genetic Analyzer Serie	313001R oder 3130XLR 4406017 oder 4406016	keine Angabe
<b>Hi-Di Formamid</b>	Applied Biosystems: • Hi-Di™ Formamid	4440753	keine Angabe
<b>Längenstandards</b>	Applied Biosystems: • Empfohlen für die Serien ABI 3130 und ABI 3500: ○ GeneScan™ 600™ LIZ® Dye Size Standard v2.0 • Alternativ für die ABI 3130 Serien: ○ GeneScan™ - 400HD ROX™ Dye Size Standard	4408399  402985 oder 4310366	keine Angabe

**Tabelle 3.** Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien

Reagenz/Material	Empfohlene Reagenzien/Materialien und Anbieter	Katalognummer	Anmerkungen
<b>Spektrale Kalibrierung Dye Set D oder G5</b>	Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> <li>Empfohlen für die Serien ABI 3130 und ABI 3500: <ul style="list-style-type: none"> <li>DS-33 Matrix Standard Kit (Dye Set G5)</li> </ul> </li> <li>Alternativ für die ABI 3130 Serien: <ul style="list-style-type: none"> <li>DS-30 Matrix Standard Kit (Dye Set D)</li> </ul> </li> </ul>	4345833 4345827	keine Angabe
<b>Polymer</b>	Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> <li>POP-7-Polymer: <ul style="list-style-type: none"> <li>POP-7™ für 3130-Serie</li> <li>POP-7™ für 3500-Serie</li> </ul> </li> </ul>	4352759 oder 4363785 4393708 oder 4393714 oder A26073	keine Angabe
<b>Puffer</b>	Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> <li>Für ABI 3130-Serie: <ul style="list-style-type: none"> <li>310 und 31xx Laufpuffer, 10x</li> </ul> </li> <li>Für ABI 3500-Serie: <ul style="list-style-type: none"> <li>Behälter für Anodenpuffer, 3500-Serie</li> <li>Behälter für Kathodenpuffer, 3500-Serie</li> </ul> </li> </ul>	402824 4393927 4408256	keine Angabe
<b>96-Well-Aluminiumfolie</b>	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe
<b>96-Well-8-Kappen-Streifen</b>	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe

### 7.3. Vorbereitung der Reagenzien

**Positiv-, Negativ- und Nicht-Template-Kontrollen** sollten für jeden Master Mix durchgeführt werden.

**Optional:** Alle unbekannt Proben können mit dem Specimen Control Size Ladder Master Mix (Größenleiter-Master-Mix für Probenkontrollen) getestet werden. So wird sichergestellt, dass sich keine Amplifikationsinhibitoren in der Probe befinden und, dass die Qualität und Quantität der DNA ausreicht, um gültige Ergebnisse zu erzielen. Der Specimen Control Size Ladder Master Mix kann separat von Invivoscribe erworben werden ([REF](#) 20960021 für ABI-Nachweis).

#### Amplifikationsmischungen

- 7.3.1. Reinigen Sie die „Dead-Air-Box“ mit 10%iger Bleichelösung gefolgt von 70 % Ethanol.
- 7.3.2. Mit behandschuhten Händen Master Mixe aus der Tiefkühlung nehmen. Lassen Sie die Röhrchen vollständig auftauen (direkte Sonneneinstrahlung vermeiden); dann sanft vortexen oder die Röhrchen 5 bis 10 Mal umdrehen, um ausreichend zu mischen.
- 7.3.3. Unter einer Schutzhaube oder in einer Dead-Air-Box ein ausreichendes Aliquot von jedem Master Mix in individuelle saubere und sterile Mikrozentrifugenröhrchen geben.
- Das Volumen der Aliquote sollte für jede Reaktion 45 µl betragen.
  - Wir empfehlen, für jeweils 15 Reaktionen eine zusätzliche Reaktion anzusetzen, um Pipettierfehler auszugleichen.
  - Daher ist die Anzahl der Reaktionen für jeden Master Mix (**n**) wie folgt:
- |            |                              |                                                      |
|------------|------------------------------|------------------------------------------------------|
| <b>n =</b> | <b>1 × Anzahl der Proben</b> |                                                      |
|            | + 1                          | Positivkontroll-DNA ( <b>FLT3-Positivkontrolle</b> ) |
|            | + 1                          | Negativkontroll-DNA ( <b>FLT3-Negativkontrolle</b> ) |
|            | + 1                          | Nicht-Template-Kontrolle (Wasser)                    |
|            | + 1                          | zum Ausgleich von Pipettierfehlern                   |
- 
- n = Anzahl der Proben + 4 Gesamt**
- Daher sollte das Aliquot-Gesamtvolumen für jeden Master Mix **n × 45 µl** betragen.

- 7.3.4. 1,25 Einheiten (oder 0,25 µl zu 5 Einheiten/µl) Taq-DNA-Polymerase pro Reaktion zu jedem Master Mix hinzugeben.
- Das Gesamtvolumen an EagleTaq-DNA-Polymerase, das zu jedem Master Mix hinzugegeben wird, beträgt daher  $n \times 0,25 \mu\text{l}$ .
  - Das Röhrchen mehrere Male zum Mischen umdrehen.
- 7.3.5. Für jede Reaktion 45 µl des relevanten Master Mix + DNA-Polymerase in individuelle Wells einer PCR-Platte oder PCR-Röhrchen überführen.
- Zum Mischen fünf- bis zehnmal auf- und abpipettieren.
- 7.3.6. Für jede Reaktion 5 µl des geeigneten Templates (Proben-DNA mit einer Konzentration von 50 µg/ml, Positivkontroll-DNA, Negativkontroll-DNA oder Wasser) zu den Wells mit den Master-Mix-Lösungen geben.
- Zum Mischen fünf- bis zehnmal auf- und abpipettieren.
- 7.3.7. Die PCR-Platte abdecken.
- Die Proben sind nun bereit für die Amplifikation im Thermocycler.

Tabelle 4. Reaktionsaufbau

Reagenz	Volumen
Master Mix	45 µl
EagleTaq-DNA-Polymerase	0,25 µl
Probe oder Kontroll-DNA	5 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>50,25 µl</b>

## 7.4. Amplifikation

- 7.4.1. Die Proben mit dem folgenden PCR-Programm amplifizieren:

Tabelle 5. PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklus
1	95 °C	5 Minuten	1
2	94 °C	30 Sekunden	35x
3	55 °C	30 Sekunden	
4	72 °C	60 Sekunden	
5	72 °C	60 Minuten	1
6	4 °C	∞	1

- 7.4.2. Amplifikationsplatte oder -röhrchen aus dem Thermocycler nehmen. Amplikons bei 2 °C bis 8 °C bis zur Analyse mit dem ABI 3130/3130xL oder ABI 3500/3500xL aufbewahren.

## 7.5. Restriktionsverdauung nur für *FLT3D835* Master Mix

- 7.5.1. Mit behandschuhten Händen NEBuffer 3.1 aus der Tiefkühlung nehmen. Vollständig auftauen lassen, zum Mischen leicht vortexen.
- 7.5.2. Unter einer Schutzhaube oder der Dead-Air-Box Folgendes zu einem sauberen, sterilen Mikrozentrifugenröhrchen geben:
- Wir empfehlen, für jeweils 15 Reaktionen eine zusätzliche Reaktion anzusetzen, um Pipettierfehler auszugleichen.
  - Daher ist die Anzahl der Reaktionen (**n**) wie folgt:

$$n = \frac{1 \times \text{Anzahl der Proben} + 1}{\text{Anzahl der Proben} + 1 \text{ Gesamt}}$$

- 7.5.3. 15,7 µl hochreines Wasser pro Reaktion zum Röhrchen hinzugeben.
- Das Gesamtvolumen an zugefügtem Wasser sollte  $n \times 15,7 \mu\text{l}$  betragen.
- 7.5.4. 2,3 µl NEBuffer 3.1 pro Reaktion zum Röhrchen hinzugeben.
- Das Gesamtvolumen an zugefügtem NEBuffer 3.1 sollte  $n \times 2,3 \mu\text{l}$  betragen.
- 7.5.5. 2 µl EcoRV-Endonuklease (20.000 Einheiten/ml) pro Reaktion zum Röhrchen hinzugeben.
- Das Gesamtvolumen an zugefügter EcoRV-Endonuklease sollte  $n \times 2 \mu\text{l}$  betragen.
  - Sanft zum Mischen vortexen.
- 7.5.6. Für jede Reaktion 20 µl der obigen Mischung in individuelle Wells einer PCR-Platte oder PCR-Röhrchen überführen.
- 7.5.7. 10 µl von jedem *FLT3*-D835-Amplikon in die relevanten Wells mit der Restriktionsverdauungsmischung geben.
- Zum Mischen einige Male auf- und abpipettieren.
- 7.5.8. Die PCR-Platte abdecken.
- 7.5.9. Bei 37 °C für mindestens 60 Minuten und bis zu 24 Stunden inkubieren.
- Amplifizierte DNA ist bei Raumtemperatur über einen längeren Zeitraum stabil, allerdings sollten PCR-Produkte bis zum Nachweis bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.
  - Der Nachweis muss innerhalb von 30 Tagen nach der Amplifikation stattfinden.

## 7.6. ABI-Fluoreszenznachweis

Bitte beachten Sie, dass der Fluoreszenznachweis oft einen vorhergehenden Peak aufweist, welcher ein Artefakt der Nachweismethode der ABI-Plattform ist. Vorhergehende Peaks sind manchmal verzerrt und haben Grundlinien, die auf der rechten Seite in Richtung des echten Peaks geneigt sind.

**Warnung:** Multiplexen von PCR-Produkten aus verschiedenen Master Mixes zusammen ist nicht empfohlen, da dies die Gesamtempfindlichkeit des Assays reduziert.

- 7.6.1. Mischen Sie in einem neuen Mikrozentrifugenröhrchen die geeignete Menge (für ein Volumen von 10 µl pro PCR-Reaktion) Hi-Di Formamid mit 600 LIZ™ Size Standards v2.0. Gründlich vortexen.
- 7.6.2. In einer neuen 96-Well-PCR-Platte 10 µl Hi-Di-Formamid mit 600 LIZ™ Size Standards v2.0 für jede Reaktion in die individuellen Wells geben.
- 7.6.3. 0,5 µl von jedem Amplikon in die Wells mit Hi-Di-Formamid mit 600 LIZ™ Size Standards v2.0 geben. Nur eine Probe pro Well hinzufügen. Zum Mischen auf- und abpipettieren.
- 7.6.4. Die PCR-Platte mit Aluminiumfolie abdecken oder einen PCR-8-Kappen-Streifen verwenden.
- 7.6.5. Die Probe bei 95 °C für 3 Minuten hitzedenaturieren dann auf Eis oder bei 4 °C für 5 Minuten schnell abkühlen.
- 7.6.6. Ein **Probenblatt** und eine **Injektionsliste** für die Proben erstellen.
- 7.6.7. Die Proben auf einem ABI-Kapillarelektrophorese-Gerät gemäß dem Benutzerhandbuch vermessen.
- 7.6.8. Die Daten werden automatisch als größen- und farbspezifische Peaks angezeigt. Prüfen Sie das Profil und die Kontrollen und erstellen Sie einen Ergebnisbericht. (Siehe Abschnitte 8 *Interpretation der Ergebnisse* und 10 *Erwartete Länge der amplifizierten Produkte* unten.)

## 7.7. Qualitätskontrolle

Positiv- und Negativkontrolle (oder Normalkontrolle) werden im Kit mitgeliefert und sollten in einfacher Ausführung bei jeder Durchführung des Assays ebenfalls durchgeführt werden, um die Leistung des Assays sicherzustellen. Zusätzlich sollte außerdem eine Nicht-Template-Kontrolle (z. B. Wasser) durchgeführt werden, um auf Kontaminationen des Master Mix oder Kreuzkontamination der PCR-Reaktionen aufgrund falscher Arbeitsweise zu prüfen. Eine Pufferkontrolle kann außerdem hinzugefügt werden, um auf eine Kontamination des Puffers für die Resuspension der Proben zu prüfen. Die Werte für die Positivkontrolle sind in Abschnitt 10 *Erwartete Längen der amplifizierten Produkte* angegeben.

## 8. Interpretation der Ergebnisse

Die Ergebnisse der Positiv- und Negativkontrolle sollten vor dem Hintergrund aller klinischen Informationen und Laborergebnisse interpretiert werden. Der Längenbereich für jeden Master Mix wurde durch Assays mit Positivkontroll- und Negativkontrollproben bestimmt. Für eine genaue und aussagekräftige Interpretation sollten Peaks, die außerhalb des geltenden Längenbereichs für jeden Master Mix liegen, ignoriert werden.

- Beachten Sie, dass das ABI-Gerät eine inhärente Variabilität von +/-1 bp für die Länge der Fragmente aufweist.

### 8.1. Analyse

- 8.1.1. Proben, die auch nach wiederholten Assays nicht amplifiziert werden können, sollten im Bericht als „**A result cannot be reported on this specimen because there was DNA of insufficient quantity or quality for analysis**“ (Für diese Probe kann kein Ergebnis aufgeführt werden, da die Quantität oder Qualität der DNA nicht für die Analyse ausreichte) aufgelistet werden.
- 8.1.2. Die Primer des *FLT3* ITD Master Mix werden mit FAM (blau) und HEX (grün), Vorwärtsprimer bzw. Rückwärtsprimer, gekennzeichnet. Die Peaks des Wildtyps (327 bp) und der Mutation (jeglicher Peak mit  $\geq 330$  bp) müssen sowohl einen blauen als auch den entsprechenden grünen Peak umfassen, um als echte Peaks zu gelten.
- 8.1.3. Primer des *FLT3* TKD Master Mix werden nur mit FAM gekennzeichnet. Ein positives *FLT3*-TKD-Ergebnis umfasst einen Mutationspeak, der  $\geq 1$  % des Wildtyppeaks entspricht. Um diesen Wert zu berechnen, teilen Sie die Höhe des Mutationspeaks (124 bp oder 127 bp für Patientenproben und 124 bp für die Positivkontrolle) durch die Höhe des WT-Peaks (79 bp). Ein negatives Ergebnis ist durch einen Mutationspeak mit  $< 1,0$  % des WT-Peaks gekennzeichnet.
- 8.1.4. Alle Assay-Kontrollen müssen vor Interpretation der Probenergebnisse geprüft werden. Sollten die Kontrollen nicht die erwarteten Ergebnisse abgeben, ist der Assay ungültig und die Proben sollten nicht interpretiert werden.

Im Folgenden wird die Analyse aller Kontrollproben und die erforderlichen Entscheidungen basierend auf den Ergebnissen beschrieben.

**Tabelle 6.** Analyse der Kontrollproben

Art der Kontrollprobe	Erwartetes Ergebnis	Abweichendes Ergebnis
<b><i>FLT3</i>-ITD-Nicht-Template-Kontrolle</b>	Keine Peaks $\geq 100$ RFU und länger als 50 bp.	Amplifikation präsent, Assay wiederholen.
<b><i>FLT3</i>-ITD-Negativkontrolle</b>	Blauer und grüner Peak bei 327 bp $\geq 4.500$ RFU	Unzureichende Amplifikation, positive/r Peak/s präsent; Assay wiederholen.
<b><i>FLT3</i>-ITD-Positivkontrolle</b>	Blauer und grüner Peak bei 327 bp $\geq 4.500$ RFU und ein blauer und grüner Peak bei 357 bp $\geq 100$ RFU	Unzureichende Amplifikation, Mutationspeak präsent; Assay wiederholen.
<b><i>FLT3</i>-TDK-Nicht-Template-Kontrolle</b>	Keine Peaks $\geq 100$ RFU und länger als 50 bp.	Amplifikation präsent, Assay wiederholen.
<b><i>FLT3</i>-TDK-Negativkontrolle</b>	Blauer Peak bei 79 bp $\geq 4.500$ RFU.	Unzureichende Amplifikation, positive/r Peak/s präsent; Assay wiederholen.
<b><i>FLT3</i>-D835-Positivkontrolle</b>	Blauer Peak bei 79 bp $\geq 4.500$ RFU und ein blauer Peak bei 124 bp $\geq 1$ % des WT-Peaks.	Unzureichende Amplifikation, Mutationspeak $< 1,0$ %; Assay wiederholen.
<b>Probenkontroll-Längenleiter (Optional)</b>	Alle der 96, 197, 297, 397 und 602 bp Peaks sind vorhanden.  Da kleinere PCR-Fragmente bevorzugt amplifiziert werden, ist es nicht ungewöhnlich, wenn die 600-bp-Fragmente ein geringeres Signal aufweisen oder gänzlich fehlen. Die Analyse fortsetzen.	Sind keine Peaks sichtbar, den Assay wiederholen, soweit <u>die Probe nicht positiv ist</u> .  Sind nur 1, 2 oder 3 Peaks sichtbar, prüfen Sie die Probe auf DNA-Abbau, soweit die <u>Probe nicht positiv war</u> .

## 8.2. Interpretation der Proben

Ergeben die Kontrollproben die erwarteten Ergebnisse, sollten die klinischen Proben wie folgt interpretiert werden:

**Tabelle 6.** Interpretation der Proben

<b>FLT3 ITD Master Mix:</b>	
<b>Positiv:</b>	Vorhandensein von Mutationspeaks (sowohl FAM als auch HEX) bei $\geq 330$ bp und $\geq 100$ RFU wird wie folgt aufgeführt: „ <b>Detection of an ITD mutation of the FLT3 gene.</b> “ (Nachweis einer ITD-Mutation des FLT3-Gens.)
<b>Negativ:</b>	Vorhandensein des Wildtyppeaks (sowohl FAM als auch HEX) bei $\geq 327$ bp ( $\geq 4.500$ RFU) ohne Peaks bei $\geq 330$ bp und $\geq 100$ RFU wird wie folgt aufgeführt: „ <b>No evidence of an ITD mutation of the FLT3 gene.</b> “ (Keine Anzeichen einer ITD-Mutation des FLT3-Gens)
<b>Keine Amplifikation:</b>	Abwesenheit eines Wildtyppeaks (327 bp für FAM und HEX) von $\geq 4.500$ RFU bei negativen Proben.
<b>FLT3 D835 Master Mix:</b>	
<b>Positiv:</b>	Vorhandensein des Mutationspeaks (FAM) bei 124 bp oder 127 bp mit $\geq 1,0$ % des Wildtyppeaks bei 79 bp wird wie folgt aufgeführt: „ <b>Detection of a TDK mutation of the FLT3 gene.</b> “ (Nachweis einer TDK-Mutation des FLT3-Gens)
<b>Negativ:</b>	Vorhandensein des Wildtyppeaks (FAM) bei 79 bp ( $\geq 4.500$ RFU) mit $< 1,0$ % des Mutationspeaks wird wie folgt aufgeführt: „ <b>No evidence of a TKD mutation of the FLT3 gene.</b> “ (Kein Anzeichen einer TKD-Mutation des FLT3-Gens)
<b>Keine Amplifikation:</b>	Abwesenheit eines Wildtyppeaks (FAM) $\geq 4.500$ RFU bei negativen Proben.

## 9. Grenzen des Verfahrens

- Dieser Assay ist in der Lage, 100 % der *FLT3*-aktivierenden Mutationen nachzuweisen.
- Dieser Assay kann weniger als 5 positive Zellen pro 100 normaler Zellen nicht zuverlässig nachweisen.
- Die Ergebnisse molekularer Tests sollten immer unter Berücksichtigung klinischer, histologischer und immunphänotypischer Daten interpretiert werden.
- PCR-basierte Assays werden vom Abbau der DNA oder der Hemmung einer PCR-Amplifikation durch EDTA, Heparin und andere Wirkstoffe beeinflusst.

## 10. Erwartete Länge der amplifizierten Proben

### 10.1. Erwartete Länge der amplifizierten Proben

Die aufgeführten Amplikonlängen wurden mit der Plattform ABI 3500xL bestimmt. Die Amplikonlängen, die mit ihrem spezifischen Kapillarelektrophorese-Gerät bestimmt wurden, können je nach der verwendeten Nachweisplattform und der Version der Analysesoftware um 1 bis 4 Nukleotide (nt) von den hier aufgelisteten abweichen. Nach der erstmaligen Bestimmung werden die Amplikonlängen auf Ihrer spezifischen Plattform von Assay zu Assay konsistent sein. Diese Reproduzierbarkeit ist besonders bei der Überwachung von Krankheitsrückfällen nützlich.

**Anmerkung:** „Farbe“ kennzeichnet die Farbe des Produkts bei Verwendung des Master Mix mit der Standardfarbzuweisung für ABI-Fluoreszenznachweissysteme.

**Tabelle 7.** Erwartete Länge der amplifizierten Produkte für den *FLT3* ITD Master Mix

Master Mix	Ziel	Farbe	Probe	Produktlänge in Nukleotiden <sup>2</sup>
<i>FLT3</i> ITD	ITD	Blau & Grün	Nicht-Template-Kontrolle	Keine Peaks $\geq 100$ RFU und länger als 50 bp.
		Blau & Grün	<i>FLT3</i> -Negativkontroll-DNA	Blauer und grüner Peak bei 327 bp $\geq 4.500$ RFU
		Blau & Grün	<i>FLT3</i> -ITD-Positivkontrolle	Blauer und grüner Peak bei 327 bp $\geq 4.500$ RFU und ein blauer und grüner Peak bei 357 bp $\geq 100$ RFU
		Blau & Grün	<i>FLT3</i> -ITD-negative Patientenprobe	Blauer und grüner Peak bei 327 bp $\geq 4.500$ RFU
		Blau & Grün	<i>FLT3</i> -ITD-positive Patientenprobe	Blauer und grüner Peak bei 330 bp $\geq 100$ RFU <b>Anmerkung: Der WT-Peak bei 327 bp kann vorhanden sein, muss aber nicht.</b>

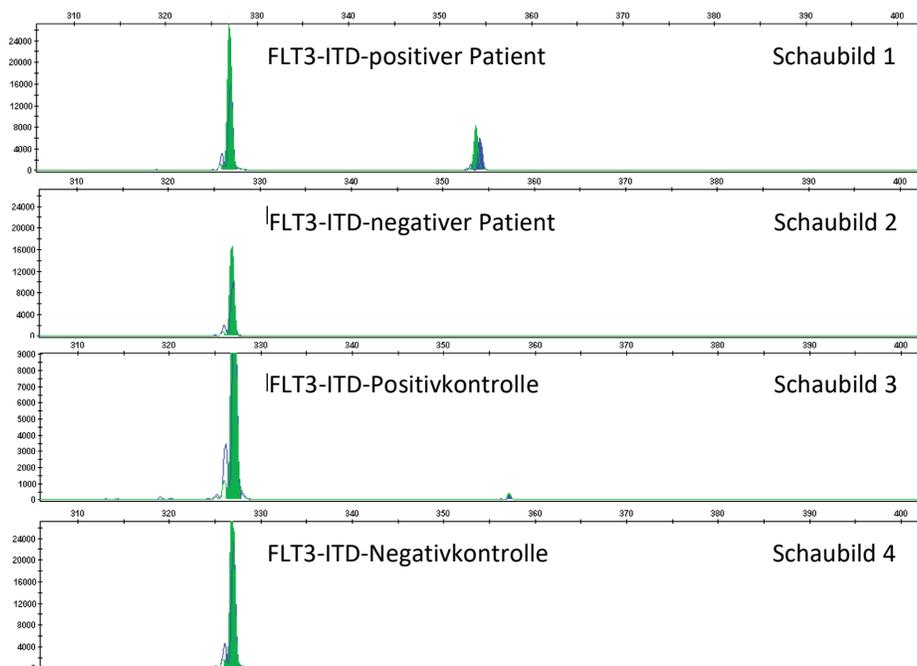
**Tabelle 8.** Erwartete Länge der amplifizierten Produkte für den *FLT3*TKD Master Mix

Master Mix	Ziel	Farbe	Probe	Produktlänge in Nukleotiden <sup>2</sup>
<i>FLT3</i> D835	TKD	Blau	Nicht-Template-Kontrolle	Keine Peaks $\geq 100$ RFU und länger als 50 bp.
		Blau	<i>FLT3</i> -Negativkontroll-DNA	Blauer Peak bei 79 bp $\geq 4.500$ RFU.
		Blau	<i>FLT3</i> -D835-Positivkontrolle	Blauer Peak bei 79 bp $\geq 4.500$ RFU und ein blauer Peak bei 124 bp mindestens 1 % des WT-Peaks.
		Blau	<i>FLT3</i> -TKD-negative Patientenprobe	Blauer Peak bei 79 bp $\geq 4.500$ RFU.
		Blau	<i>FLT3</i> -TKD-positive Patientenprobe	Blauer Peak bei 124 bp oder 127 bp mit mindestens 1 % des WT-Typs. <b>Anmerkung: Der WT-Peak bei 79 bp kann vorhanden sein, muss aber nicht.</b>

**Anmerkung bezüglich der TKD-Interpretation:** Einige unverdaute EcoRV-Produkte können als blauer Peak bei 147 bp vorhanden sein. Ist nur der Peak bei 147 bp oder der Peak bei 147 bp beträgt  $\geq 1$  % des WT-Peaks, muss die Probe erneut gemessen werden, entweder beginnend vom Amplifikationsschritt oder dem Schritt der EcoRV-Verdauung.

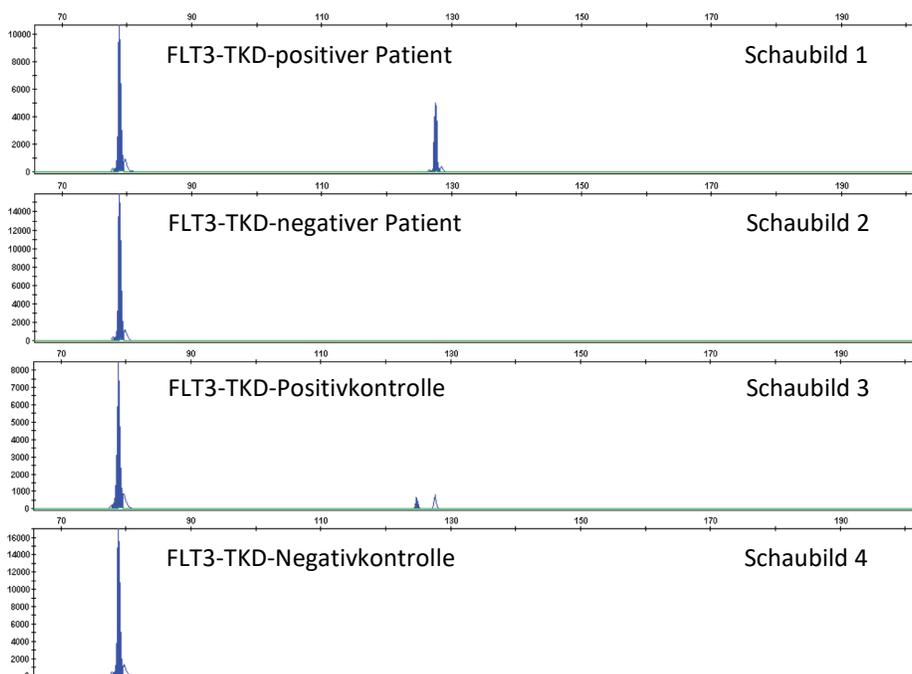
## 10.2. Beispieldaten

Die folgenden Daten wurden mit dem angegebenen Master Mix erhalten. Die amplifizierten Produkte wurden mit einem ABI-3500xL-Gerät gemessen.

**Abbildung 2.**

Für den *FLT3*ITD Master Mix:

- Schaubild 1 zeigt die Daten der positiven Patientenproben.
- Schaubild 2 zeigt die Daten der negativen Patientenproben.
- Schaubild 3 zeigt die Daten der Positivkontrolle.
- Schaubild 4 zeigt die Daten der Negativkontrolle.



**Abbildung 3.** Für den *FLT3* D835 Master Mix (Abbildung 3):

- Schaubild 1 zeigt die Daten der positiven Patientenproben.
- Schaubild 2 zeigt die Daten der negativen Patientenproben.
- Schaubild 3 zeigt die Daten der Positivkontrolle.
- Schaubild 4 zeigt die Daten der Negativkontrolle.

## 11. Leistungseigenschaften

Die Validierung des LeukoStrat *FLT3* Mutation Assay 2.0 belegt, dass der Assay *FLT3*-ITD- und -TKD-Mutationen mit einer Übereinstimmung von  $\geq 90\%$  im Vergleich mit dem Roche 454 Sequencing Kit nachweisen kann. In dieser Validierungsstudie wurde die Fähigkeit des Assays, *FLT3*-Mutationen nachzuweisen, unter Bewertung des Einflusses verschiedener Anwender, Reagenzienchargen, ABI-3500xL-Geräte und nicht aufeinanderfolgender Messtage geprüft. PPA und NPA für klinische Proben, künstlich hergestellte positive Proben und künstlich hergestellte negative Proben übertreffen  $90\%$  im Vergleich der Ergebnisse des LeukoStrat *FLT3* Mutation Assay 2.0 und 454 Sequencing Kits.

### 11.1. Zusammenfassung der Daten

Die künstlich hergestellten *FLT3*-ITD-positiven Proben waren zu  $5\%$  ITD-positiv,  $50\%$  ITD-positiv und ITD-negativ. Jede künstlich hergestellte Probe wurde mit drei Wiederholungen mit zwei verschiedenen Master-Mix-Chargen, zwei verschiedenen Anwendern, über den Verlauf von 5 nicht aufeinanderfolgenden Tagen getestet, wodurch 60 Wiederholungen für jede künstlich hergestellte Probe erzielt wurden. Insgesamt 10 klinische Proben wurden einfach mit zwei verschiedenen Master-Mix-Chargen, zwei verschiedenen Anwendern, über den Verlauf von 5 nicht aufeinanderfolgenden Tagen getestet, wodurch 20 Wiederholungen für jede klinische Probe erzielt wurden. Für jedes Protokoll wurden Assays mit fehlgeschlagenen Kontrollproben für die Endanalyse verworfen. Eine Übereinstimmung von  $100\%$  und  $98\%$  wurde für die künstlich hergestellten bzw. klinischen Proben erzielt (siehe Tabelle 10). Positiv- und Negativkontrollen wurden in dieser Berechnung nicht berücksichtigt. Die klinische Probe ITD-6 wurde bei 4 von 20 Replikaten falsch eingestuft.

**Tabelle 9.** ITD-Probenlänge und Probenübereinstimmung mit 454 Sequencing

Probe	Ergebnis	N	% Übereinstimmung	Anmerkungen
<b>Positivkontrolle</b>	Positiv	17	100 %	keine Angabe
<b>5 % Positiv</b>	Positiv	51	100 %	keine Angabe
<b>50 % Positiv</b>	Positiv	51	100 %	keine Angabe
<b>ITD-1</b>	Positiv	17	100 %	keine Angabe
<b>ITD-3</b>	Positiv	17	100 %	keine Angabe

**Tabelle 9.** ITD-Probenlänge und Probenübereinstimmung mit 454 Sequencing

Probe	Ergebnis	N	% Übereinstimmung	Anmerkungen
<b>ITD-4</b>	Positiv	17	100 %	keine Angabe
<b>ITD-5</b>	Positiv	17	100 %	keine Angabe
<b>ITD-6</b>	Negativ	4	20 %	FAM (HEX-Peaks 101 – 113 RFU)
	Positiv	13	80 %	
<b>ITD-7</b>	Positiv	17	100 %	keine Angabe
<b>Negativkontrolle</b>	Negativ	17	100 %	keine Angabe
<b>Negativ</b>	Negativ	51	100 %	keine Angabe
<b>ITD-2</b>	Negativ	17	100 %	keine Angabe
<b>ITD-8</b>	Negativ	17	100 %	keine Angabe
<b>ITD-9</b>	Negativ	17	100 %	keine Angabe
<b>ITD-10</b>	Negativ	17	100 %	keine Angabe

Die künstlich hergestellten *FLT3*-TKD-positiven Proben waren zu 5 % TKD-positiv, 50 % TKD-positiv und TKD-negativ. Jede künstlich hergestellte Probe wurde mit drei Wiederholungen mit zwei verschiedenen Master-Mix-Chargen, zwei verschiedenen Anwendern, über den Verlauf von 5 nicht aufeinanderfolgenden Tagen getestet, wodurch 60 Wiederholungen für jede künstlich hergestellte Probe erzielt wurden. Insgesamt 10 klinische Proben wurden einfach mit zwei verschiedenen Master-Mix-Chargen, zwei verschiedenen Anwendern, über den Verlauf von 5 nicht aufeinanderfolgenden Tagen getestet, wodurch 20 Wiederholungen für jede klinische Probe erzielt wurden. Eine Übereinstimmung von 100 % wurde für die künstlich hergestellten und die klinischen Proben erzielt (siehe Tabelle 11). Positiv- und Negativkontrollen wurden in dieser Berechnung nicht berücksichtigt. Drei der 60 Replikate der künstlich hergestellten TKD-negativen Proben wurden nicht ausreichend amplifiziert und wurden daher aus dem Set für die NPA-Analyse ausgeschlossen.

**Tabelle 10.** TKD-Probenlänge und Probenübereinstimmung mit 454 Sequencing

Probe	Ergebnis	N	% Übereinstimmung	Anmerkungen (Diskrepanzen)
<b>Positivkontrolle</b>	Positiv	20	100 %	keine Angabe
<b>5 % Positiv</b>	Positiv	60	100 %	keine Angabe
<b>50 % Positiv</b>	Positiv	60	100 %	keine Angabe
<b>TKD-2</b>	Positiv	20	100 %	keine Angabe
<b>TKD-3</b>	Positiv	20	100 %	keine Angabe
<b>TKD-4</b>	Positiv	20	100 %	keine Angabe
<b>TKD-6</b>	Positiv	20	100 %	keine Angabe
<b>TKD-7</b>	Positiv	20	100 %	keine Angabe
<b>TKD-10</b>	Positiv	20	100 %	keine Angabe
<b>Negativkontrolle</b>	Negativ	20	100 %	keine Angabe
<b>Negativ</b>	Negativ	57	100 %	3/60 (5 %) Amplifikation nicht ausreichend
<b>TKD-1</b>	Negativ	20	100 %	keine Angabe
<b>TKD-5</b>	Negativ	20	100 %	keine Angabe
<b>TKD-8</b>	Negativ	20	100 %	keine Angabe
<b>TKD-9</b>	Negativ	20	100 %	keine Angabe

## 11.2. Datenanalyse

Bei den künstlich hergestellten *FLT3*-ITD-negativen Proben wurden keine abweichenden Ergebnisse erhalten (119/119 Übereinstimmung), sodass der NPA-Wert bei 100 % liegt (siehe Tabelle 12).

Bei den künstlich hergestellten *FLT3*-ITD-positiven Proben wurden 4 abweichende Ergebnisse erhalten (200/204 Übereinstimmung), sodass der PPA-Wert bei 98,0 % liegt (siehe Tabelle 12). Die klinische Probe ITD-6 war gemäß 454 Sequencing eine bekannte *FLT3*-ITD-positive Probe, allerdings ergaben 4 der 20 Replikate mit dem LeukoStrat *FLT3* Mutation Assay 2.0 negative Ergebnisse.

**Tabelle 11.** Prozentuale Übereinstimmung mit 454 Sequencing für ITD

	% Übereinstimmung	Nicht- übereinstimmung #	Übereinstimmung #	*95 % LL
<b>NPA</b>	100 %	0	119	96,9 %
<b>PPA</b>	98,0 %	4	200	95,1 %

\*95 % der Ergebnisse würden erwartungsgemäß mit Sequenzierung mit einer Häufigkeit, die gleich oder geringer der Untergrenze (lower limit, LL) ist, übereinstimmen.

Für die bekannten *FLT3*-TKD-negativen Proben gab es keine abweichenden Ergebnisse (137/137), sodass der NPA-Wert (siehe Tabelle 13) zwischen den Ergebnissen für 454 Sequencing und dem LeukoStrat *FLT3* Mutation Assay 2.0 bei 100 % liegt.

Für die bekannten *FLT3*-TKD-positiven Proben gab es keine abweichenden Ergebnisse (240/240), sodass der PPA-Wert (siehe Tabelle 13) zwischen den Ergebnissen für 454 Sequencing und dem LeukoStrat *FLT3* Mutation Assay 2.0 bei 100 % liegt.

**Tabelle 12.** Prozentuale Übereinstimmung mit 454 Sequencing für TKD

	% Übereinstimmung	Nicht- übereinstimmung #	Übereinstimmung #	*95 % LL
<b>NPA</b>	100 %	0	137	96,9 %
<b>PPA</b>	100 %	0	240	98,5 %

\*95 % der Ergebnisse würden erwartungsgemäß mit Sequenzierung mit einer Häufigkeit, die gleich oder geringer der Untergrenze (lower limit, LL) ist, übereinstimmen.

Die Gesamtakzeptanz für *FLT3*-ITD und *FLT3*-TKD betrug 85 % bzw. 100 %. Die individuelle Validität für ITD und TKD betrug 85 % bzw. 99,2 %.

## 11.3. Schlussfolgerungen

Die Validierung des LeukoStrat *FLT3* Mutation Assay 2.0 belegt, dass der Assay *FLT3*-ITD- und *FLT3*-TKD-Mutationen mit einer Übereinstimmung von mindestens  $\geq 90$  % im Vergleich mit 454 Sequencing nachweisen kann.

## 12. Verweise

1. Murphy, KM. et al., (2003). [Detection of FLT3 Internal Tandem Duplication and D835 Mutations by a Multiplex Polymerase Chain Reaction and Capillary Electrophoresis Assay](#). The Journal of Molecular Diagnostics 5, 96 – 102.
2. Yamamoto, Y. et al., (2001). [Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies](#). Blood 97, 2434-2439.

## 13. Technischer Support und Kundendienst

### Kontaktdaten



Invivoscribe, Inc

10222 Barnes Canyon Road | Building 1 | San Diego | California 92121-2711 | USA

Telefon: +1 858 224-6600 | Fax: +1 858 224-6601 | Geschäftszeiten: 7:00 Uhr bis 17:00 Uhr PST/PDT

Technischer Kundendienst: [support@invivoscribe.com](mailto:support@invivoscribe.com) | Kundenbetreuung: [sales@invivoscribe.com](mailto:sales@invivoscribe.com) | Webseite: [www.invivoscribe.com](http://www.invivoscribe.com)

Vertreter des technischen und Kundendienstes stehen montags bis freitags zur Verfügung, um Anfragen per Telefon, E-Mail oder über die Webseite zu beantworten.

## 14. Symbole

Auf Etiketten der Invivoscribe-NGS-Produkte finden sich folgende Symbole:

	Katalognummer		Verfallsdatum
	Reagenzvolumen		Autorisierter Vertreter in der Europäischen Gemeinschaft
	Chargennummer		Gebrauchsanweisung Beachten
	Lagerbedingungen		<i>In-vitro</i> -Diagnostikum
	Eindeutige Geräteerkennung		Hersteller
	UK-Konformität Geprüft		Verantwortliche Person im Vereinigten Königreich
	Bevollmächtigter Schweizer Vertreter		Europäische Konformität

## 15. Haftungshinweis

Dieses Produkt ist ein *In-vitro*-Diagnostikum; nicht zum Verkauf oder zur Verwendung in Nordamerika verfügbar.

### 15.1. Gewährleistung und Haftung

Invivoscribe, Inc. (Invivoscribe®) verpflichtet sich, Produkte von höchster Qualität anzubieten. Invivoscribe® garantiert, dass die Produkte die in der Gebrauchsanweisung beschriebenen Leistungsstandards für Produkte mit einer solchen Beilage erfüllen oder übertreffen. Wenn ein Produkt von den Produktspezifikationen abgedeckt ist und nicht wie angegeben funktioniert, besteht unsere Richtlinie darin, das Produkt zu ersetzen oder den vollen Kaufpreis gutzuschreiben. Invivoscribe® gibt keine weiteren Garantien jeglicher Art, weder ausdrücklich noch stillschweigend. Die Haftung von Invivoscribe® übersteigt nicht den Kaufpreis des Produkts. Invivoscribe haftet nicht für direkte, indirekte, Folge- oder zufällige Schäden, die sich aus der Verwendung, den Ergebnissen der Verwendung oder der Unfähigkeit ergeben, seine Produkte zu verwenden; Die Produktwirksamkeit unter vom Käufer kontrollierten Bedingungen im Labor des Käufers muss durch vom Käufer definierte und kontrollierte Prozesse ermittelt und kontinuierlich überwacht werden, einschließlich, aber nicht beschränkt auf, intern validierte Positiv-, Negativ- und Blindkontrolltests, wenn eine Probe analysiert wird. Mit der Bestellung, Annahme und Verwendung des Produkts übernimmt der Käufer die alleinige Verantwortung für die Sicherstellung der Produktwirksamkeit und erklärt sich mit der Haftungsbeschränkung gemäß diesem Absatz einverstanden.

### 15.2. Patente und Warenzeichen

Viele dieser Produkte erfordern Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren wie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Durch den Kauf dieses Produkts wird dem Käufer im Rahmen dieser Patente keine Lizenz zur Verwendung von Amplifikationsprozessen oder Enzymen ausdrücklich oder stillschweigend gewährt.

©2023 Invivoscribe, Inc. Alle Rechte vorbehalten. Hier erwähnte Warenzeichen sind Eigentum von Invivoscribe, Inc. und/oder seinen verbundenen Unternehmen oder (in Bezug auf die hierin verwendeten Warenzeichen anderer) ihrer jeweiligen Eigentümer.